中国科学 B辑:化学 2009 年 第 39 卷 第 8 期: 747 ~ 751
www.scichina.com chem.scichina.com
《中国科学》杂志社
SCIENCE IN CHINA PRESS

新型单分散血清白蛋白印迹微球的制备

刘晋湘[①], 邓启良[①②], 张丽华[①*], 梁振[①], 张玉奎[①]

① 国家色谱研究分析中心, 中国科学院分离分析化学重点实验室, 大连化学物理研究所, 大连 116023;
② 天津科技大学理学院, 天津 300222
* 通讯作者, E-mail: lihuazhang@dicp.ac.cn

收稿日期: 2009-05-30; 接受日期: 2009-06-19

摘要 以猪血清白蛋白(PSA)为模板, 采用分级印迹方法, 制备了新型单分散多孔蛋白质表面印迹微球. 将PSA吸附在 5 μm粒径、1000 Å孔径的球形硅胶表面及孔内后, 将甲基丙烯酰胺、甲基丙烯酸为功能单体、甲叉双丙烯酰胺为交联剂的聚合物溶液, 通过真空负压引入到硅胶孔内, 并在室温下聚合 24 h. 反应完成后, 用 3 mol/L NH_4HF_2刻蚀硅胶, 获得形状和结构与硅胶颗粒互补的PSA印迹聚合物微球. 竞争吸附实验结果表明, 在非模板蛋白质存在的情况下, 实现印迹颗粒对模板蛋白的高选择性吸附, 选择因子达到 3.6, 说明该印迹聚合物材料有望成为一种可以同生物抗体相媲美的新型亲和材料.

关键词
蛋白质分子印迹技术
分级印迹
聚合物颗粒
血清白蛋白

1 引言

分子识别在生命演变过程中起着重要的作用. 因此, 近年来人工模拟分子识别引起了人们广泛的关注. 其中, 分子印迹技术(molecular imprinting technique, MIT)具有高效、通用等特点, 已被用于制备具有特异性识别和结合位点的材料[1,2]. 在制备过程中, 功能单体先围绕模板分子排列, 在和交联剂、引发剂发生聚合反应后, 将模板分子洗脱, 即可在聚合物中形成与模板分子形状、电荷分布等互补的识别孔穴. 由于分子印迹技术涉及高分子化学、材料科学、生物化学、主客体化学和超分子化学等学科, 是极具挑战性的研究领域之一.

目前小分子化合物的印迹技术已比较成熟, 合成的印迹材料已被用于色谱固定相、固相萃取、传感器、有机合成等领域[3~5]. 但是由于分子印迹在很大程度上依赖于有机相中模板与功能单体之间的氢键相互作用, 而绝大多数生物大分子难溶于有机溶剂, 且体积庞大、构象易变、空间结构和化学性质复杂, 因此, 目前生物大分子印迹材料的制备还处于初级阶段[6,7].

由于采用传统的本体聚合方法制备蛋白质分子印迹材料时, 需要将合成后的整体材料磨碎、过筛, 因此形成的材料粒径较大(5~100 μm)、形状不规则, 且损失严重. 此外, 由于大多数印迹位点位于材料内部, 因此, 模板蛋白质的吸附和解吸速率较慢. 尽管采用表面印迹技术可以加快蛋白质的传质速度, 但目前已发展的方法在制备时间、吸附容量、选择性等方面有待提高[8,9].

本文将用于合成小分子印迹材料的分级印迹法[10,11]首次用于蛋白质印迹聚合物颗粒的制备, 制备了新型猪血清白蛋白(PSA)表面印迹聚合物颗粒, 实现了模板蛋白质的高选择性吸附.

2 实验部分

2.1 主要试剂与仪器

PSA、细胞色素 C(CYC)、核糖核酸酶 B(RNB)和 β-乳球蛋白(Lact)均购自 Sigma 公司. 甲基丙烯酰胺、甲基丙烯酸、甲叉双丙烯酰胺、过硫酸铵和 *N*,*N*,*N*′,*N*′-四甲基乙二胺(TEMED)购自 Acros organics 公司. 十二烷基磺酸钠(SDS)购自 Madison 公司. 硅胶(粒径 5 μm, 1000 Å)购自大连思谱精工有限公司. 乙腈(液相色谱级)购自 Merck 公司. 纯水由 Milli-Q 系统制备. 其它试剂均为分析纯. 所有高效液相色谱(HPLC)实验均采用岛津 LC-20AD HPLC 仪.

2.2 印迹颗粒的制备

称取 0.5 g硅胶, 加少量磷酸盐缓冲液(pH 5~6 匀浆后装入固相萃取管. 用真空泵将缓冲溶液抽出, 使硅胶填充密实. 之后不断向硅胶中加入 5 mg/mL的PSA溶液, 直至抽滤液中有蛋白质检出. 随后, 用缓冲溶液洗去硅胶孔内残留的蛋白质溶液. 再加入 2 mL聚合溶液(甲基丙烯酰胺 250 mg、甲基丙烯酸 15 mg、甲叉双丙烯酰胺 400 mg、10 mmol·L^{-1}磷酸盐缓冲液(pH 5~6)和 4.0 mL 10%(*W*/*V*)过硫酸铵溶液 20 μL, TEMED14 μL), 并利用真空泵将聚合溶液液面吸至低于硅胶表面. 密封固相萃取管两端后, 在室温下反应 24 h. 随后, 用 3 mol·L^{-1}的NH_4HF_2将硅胶刻蚀完全, 形成印迹聚合物微球. 用 10%(*W*/*V*)的SDS和 10%(*V*/*V*)乙酸的混合溶液洗脱模板蛋白后, 再用纯水洗至中性, 晾干. 非印迹颗粒合成过程除不加蛋白质溶液外, 其余与印迹颗粒合成过程相同.

2.3 相关计算公式

吸附容量按以下公式计算:

$$Q = (C_0 - C_t)V/W,$$

其中, C_0为起始溶液中蛋白浓度(mg/mL); C_t为溶液中剩余蛋白浓度(mg/mL); V为溶液体积(mL); W为聚合物质量(g).

解离常数按以下公式计算:

$$Q_0/C_0 = Q_{max}/K_d - Q_0/K_d,$$

其中, Q_0为结合在印迹颗粒上的蛋白浓度(mg/mL); C_0为溶液中剩余蛋白浓度(mg/mL); Q_{max}为印迹颗粒最大吸附容量(mg/g); K_d为解离常数.

印迹因子按以下公式计算:

$$IF = Q_{MIP}/Q_{NIP},$$

其中, Q_{MIP}为印迹聚合物的吸附量(mg/g); Q_{NIP}为非印迹聚合物的吸附量(mg/g).

2.4 竞争性吸附实验

混合蛋白质吸附实验过程如下: 印迹颗粒和非印迹颗粒各称取 50 mg, 加入 1.0 mL CYC、RNB、Lact 和 PSA 的混合溶液, 其中各蛋白质的浓度均为 0.4 mg/mL. 吸附 24 h 后, 取上清液, 用 HPLC 测定溶液中剩余的蛋白质浓度.

2.5 HPLC 实验条件

色谱柱: 4.6×250 mm; 粒径 5 μm, 孔径 300 Å 的 C8 键合硅胶填料; 流动相: A: 5%(*V*/*V*) 乙腈＋0.1%(*V*/*V*)三氟乙酸, B: 90%(*V*/*V*)乙腈＋0.1%(*V*/*V*)三氟乙酸; 梯度: 0~40 min, 20%~100% B; 流速: 1 mL/min; 检测波长: 214 nm.

3 结果与讨论

利用物理吸附将模板蛋白质固载在硅胶表面和孔道内, 不仅可以降低蛋白质固定与洗脱的难度, 而且有利于维持其构象稳定. 此外, 选用全水相聚合溶液体系, 在保持模板蛋白质活性的同时, 可以提高印迹材料的亲水性, 减少对非模板蛋白质的非特异性吸附. 因此, 最终选用甲基丙烯酰胺和甲基丙烯酸为双功能单体, 可以增加与模板蛋白质的作用位点以及作用类型, 提高功能单体与模板蛋白质间的作用力和对环境变化的耐受性. 选择甲叉双丙烯酰胺为交联剂, 可以进一步提高印迹聚合物的亲水性.

将 PSA 吸附在硅胶颗粒表面和孔道内外, 在其周围发生聚合反应, 并蚀刻去硅胶基质, 即可获得单分散PSA印迹聚合物颗粒. 从图1硅胶与印迹颗粒的扫描电镜图的对比可以看出, 硅胶表面较为光滑, 而且上面有许多小孔; 印迹颗粒的外形正好和硅胶完全互补, 且形状规则.

经条件优化, 最佳聚合条件为 4.0 mL磷酸盐缓冲液(10 mmol·L^{-1}, pH 5~6)中含有 250 mg甲基丙烯酰胺、15 mg甲基丙烯酸、400 mg甲叉双丙烯酰胺、20 μL 10%(*W*/*V*)过硫酸铵溶液和 14 μL TEMED.

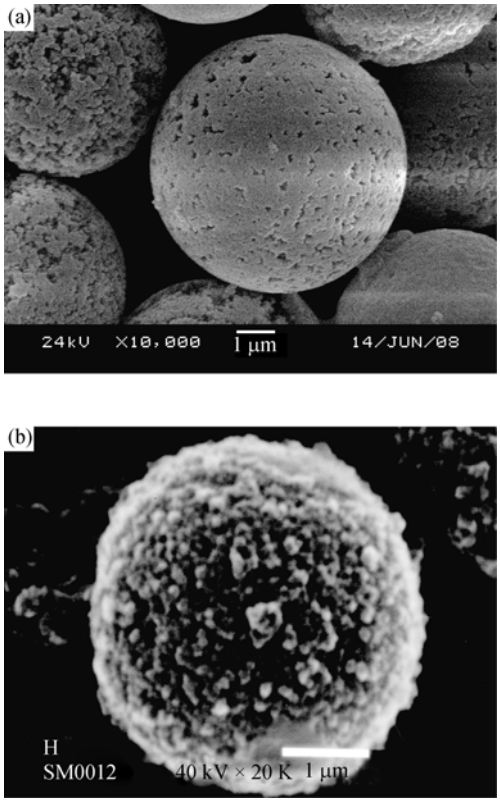

图 1 硅胶(a)与印迹颗粒(b)的扫描电镜图

印迹和非印迹颗粒的产率分别是每克硅胶 100 和 300 mg 聚合物颗粒. 因为在印迹颗粒合成过程中, 需要先将模板蛋白吸附到硅胶表面和孔道内部, 导致颗粒孔径变小. 因此, 在相同负压作用下, 可进入颗粒内部的聚合反应溶液量减少, 导致印迹颗粒的产率要低于非印迹颗粒.

印迹和非印迹颗粒对模板蛋白质的吸附容量分别是每克聚合物 10 mg和 2 mg PSA, 说明印迹颗粒对模板蛋白质具有更大的吸附能力. 印迹颗粒对模板蛋白质的解离常数大约为 3.04×10^{-7} mol·L^{-1}, 与文献报道的最好水平(10^{-5}~10^{-7} mol·L^{-1})相当. 此外, 通过刻蚀除去全部硅胶基质后, PSA印迹位点完全处于颗粒和通道表面, 因此蛋白质的吸附和解吸可以分别在 10 和 15 min内完成.

考察了印迹和非印迹颗粒对 PSA、CYC、RNB 和 Lact 混合物的选择性吸附. Lact 与 PSA 等电点非常接近, 可用来评价制备材料对等电点相近蛋白质的选择性; CYC 和 RNB 的等电点与 PSA 相差较大, 可用来评价制备材料对其他蛋白质的非特异性吸附能力. 图 2 中(a)~(c)分别为 4 种蛋白质混合物、非印迹颗粒吸附后和印迹颗粒吸附后溶液中残留蛋白质的 HPLC 谱图. 可以看出, 非印迹颗粒对各种蛋白质的吸附均较小, 说明材料具有较好的亲水性, 对蛋白质的非特异性吸附小. 然而印迹颗粒对 PSA 表现出很高的选择性吸附能力, 对 PSA、CYC、RNB 和 Lact 的印迹因子分别为 3.6、1.5、1.0 和 1.0.

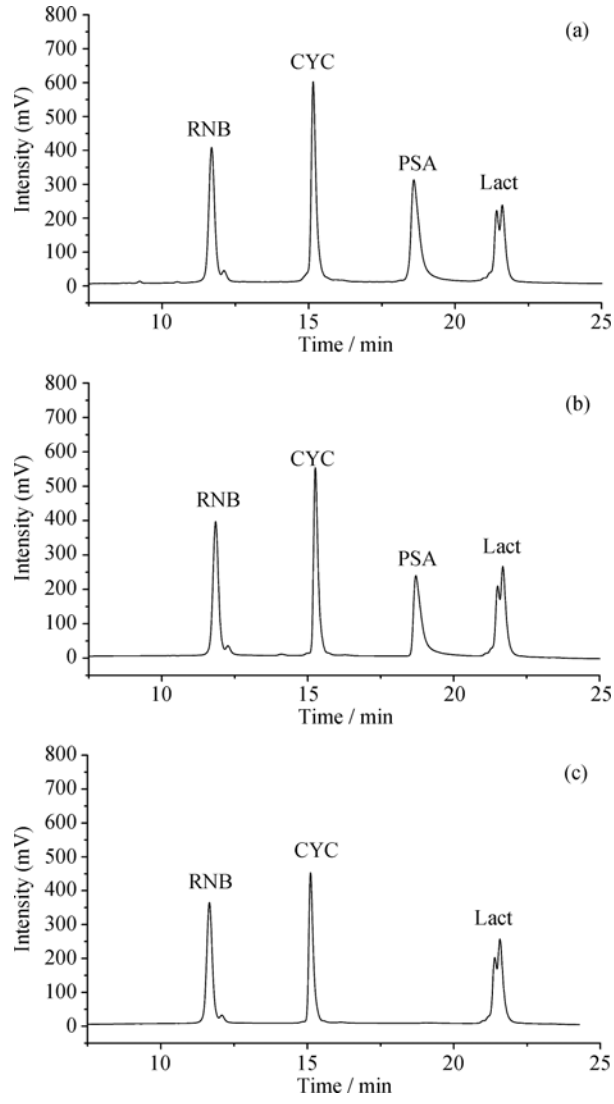

图 2 4 种蛋白质的混合溶液(a)、经非印迹颗粒处理后上清液(b)和经印迹颗粒处理后上清液(c)的 HPLC 谱图

HPLC 条件见 2.5 节

上述实验结果表明, 采用分级印迹技术制备蛋白质分子印迹聚合物具有选择性高、吸附速度快、材料制备过程简单等优点.

4 结论

以球形大孔硅胶颗粒为基质, 发展了基于分级印迹法的蛋白质分子印迹材料制备技术, 获得了单分散的 PSA 印迹聚合物颗粒. 实验结果表明, 制备的印迹颗粒对模板分子有较好的特异性识别能力. 有望成为一种可以和生物抗体相媲美的新型亲和材料.

致谢 作者感谢 Universitat Dortmund 大学 Börje Sellergren 博士在分级印迹材料制备流程方面给予的帮助. 本工作得到国家重大科学研究计划(编号: 2007CB914100)、中德合作计划(编号: GZ3164)和中国科学院知识创新工程重要方向性项目(批准号: KJCX2YW.H09)资助, 表示感谢.

参考文献

1 Wulff G. Molecular imprinting in cross-linked materials with the aid of molecular templates——A way towards artificial antibodies. Angew Chem Int Ed, 1995, 34: 1812—1832[DOI]

2 Mosbach K, Ramstrom O. Synthesis and catalysis by molecularly imprinted materials. Curr Opin Chem Biol, 1999, 3: 759—764[DOI]

3 Kempe M, Mosbach K. Direct resolution of naproxen on a non-covalently molecularly imprinted chiral stationary phase. J Chromatogr A, 1994, 664: 276—279[DOI]

4 Unsal E, Camli S T, Senel S, Tuncel A. Chromatographic performance of monodisperse-macroporous particles produced by "Modified Seeded Polymerization." I: Effect of monomer/seed latex ratio. J Appl Polym Sci, 2004, 92: 607—618[DOI]

5 Sellergren B, Karmalkar R N, Shea K J. Enantioselective ester hydrolysis catalyzed by imprinted polymers. 2. J Org Chem, 2000, 65: 4009—4027[DOI]

6 Bossi A, Bonini F, Turner A P F, Piletsky S A. Molecularly imprinted polymers for the recognition of proteins: The state of the art. Biosens Bioelectron, 2007, 22: 1131—1137[DOI]

7 Turner N W, Jeans C W, Brain K R, Allender C J, Hlady V, Britt D W. From 3D to 2D: A review of the molecular imprinting of proteins. Biotechnol Prog, 2006, 22: 1474—1489

8 Shiomi T, Matsui M, Mizukami F, Sakaguchi K. A method for the molecular imprinting of hemoglobin on silica surfaces using silanes. Biomaterials, 2005, 26: 5564—5571[DOI]

9 Bonini F, Piletsky S, Turner A P F, Speghini A, Bossi A. Surface imprinted beads for the recognition of human serum albumin. Biosens Bioelectron, 2007, 22: 2322—2328[DOI]

10 Titirici M M, Hall A J, Sellergren B. Hierarchical imprinting using crude solid phase peptide synthesis products as templates. Chem Mater, 2003, 15: 822—824[DOI]

11 Titirici M M, Sellergren B. Peptide recognition via hierarchical imprinting. Anal Bioanal Chem, 2004, 378: 1913—1921[DOI]

Preparation of monodisperse imprinting microspheres for Serum Albumin

LIU JinXing[1], DENG QiLiang[1,2], ZHANG LiHua[1*], LIANG Zhen[1] & ZHANG YuKui[1]

1. National Chromatographic R. & A. Center, Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academic of Sciences, Dalian 116023, China
2. College of science, Tianjin university of Science and Technology, Tianjin 300222, China

Abstract: monodisperse imprinted microspheres with porcine serum albumin (PSA) as the template were prepared by hierarchical imprinting. Methacrylamide and methacrylic acid were used as functional monomers, and N, N′-bisacrylamide, as cross-linkers. Silica (5 μm, 1000 Å) was used as porogen. After polymerization, silica was etched by 3 mol/L NH_4HF_2 and imprinting microspheres were obtained which morphology was just complementary with silica. The binding experiment showed that MIPs exhibit high selectivity and affinity to the template protein-PSA in a competitive environment and the imprinting factor of MIPs for PSA was about 3.6. This easy preparation protocol of imprinted microspheres makes the approach a promising solution to synthesize "artificial antibodies".

Keywords: molecular imprinting, hierarchical imprinting, polymer microsphere, serum albumin